

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



AUSGEGEBEN AM  
27. MÄRZ 1956

DEUTSCHES PATENTAMT

000015

# PATENTSCHRIFT

Nr. 968 752

KLASSE 12a GRUPPE 6

INTERNAT. KLASSE C 08b

H 22763 IV b/12a

Dr. Karl Vogler, Basel (Schweiz)  
ist als Erfinder genannt worden

F. Hoffmann-La Roche & Co. Aktiengesellschaft, Basel (Schweiz)

## Verfahren zur Herstellung von Chondroitinpolyschwefelsäureestern

Patentiert im Gebiet der Bundesrepublik Deutschland vom 23. Januar 1955 an

Patentanmeldung bekanntgemacht am 30. August 1956

Patenterteilung bekanntgemacht am 13. März 1958

Die Priorität der Anmeldung in der Schweiz vom 29. Januar 1954 ist in Anspruch genommen

Die Herstellung von Polyschwefelsäureestern der Chondroitinschwefelsäure ist seit langem bekannt (S. Bergström, Z. physiol. Chem., 238, 163 [1936]). Das ursprüngliche Verfahren von Bergström ist seither schon wiederholt, auch mit gewissen Varianten, nachgearbeitet worden (P. Karrer, Helv. Chim. Acta 26, 1309 [1943]; E. Husemann und andere, Z. Ges. Exp. Med., 114, 722 [1945]; J. Piper, Acta Pharm. Toxicol., 2, 317 [1946], Nr. 4). Alle diese Verfahren haben bis jetzt zu keinem klinisch verwertbaren Anti-

koagulans geführt, weil die Produkte zu toxisch waren.

F. Patat und K. Vogler (Helv. Chim. Acta, 35, 120 [1952]) haben festgestellt, daß die Toxizität von modellmäßigen Polyschwefelsäureestern des Polyvinylalkohols eine Funktion des Polymerisationsgrades ist und daß sie sich mit dem Polymerisationsgrad kontinuierlich ändert. Ein ähnliches Verhalten, d. h. ein allmählicher Übergang zu weniger toxischen Produkten bei fallendem Polymerisationsgrad, war

388 782

somit auch bei den partiell abgebauten Chondroitinpolyschwefelsäureestern zu erwarten. Auch die gerinnungshemmende Wirkung von bisher bekannten Produkten nimmt mit fallendem Polymerisationsgrad ab, wobei sich zwischen den Kurven der Toxizität und der gerinnungshemmenden Aktivität eine weitgehende Parallelität erkennen läßt.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß bei einem Schwefelgehalt von 13,5 bis 14,5% die genannte Parallelität im Bereich der Viskositätszahlen  $[\eta]$  von 0,07 bis 0,045 verschwindet. Während die Kurve der Gerinnungshemmung keine Änderung ihrer Steilheit erfährt, fällt die Toxizitätskurve im genannten Viskositätsbereich steil ab. Unterhalb dieses Viskositätsbereiches sind die Chondroitinpolyschwefelsäureester praktisch nicht toxisch, während sie oberhalb dieses Viskositätsbereiches ihrer Toxizität wegen unbrauchbar sind. So geht z. B. ein Hund bei täglicher Injektion von 20 mg pro kg Tiergewicht eines abgebauten Chondroitinpolyschwefelsäureesters mit einer Viskositätszahl  $[\eta]$  von 0,07 und einem Schwefelgehalt von 14% binnen 12 Tagen unter starker Gewichtsabnahme zugrunde, während unter gleichen Bedingungen 20 mg pro kg eines abgebauten Chondroitinpolyschwefelsäureesters mit der Viskositätszahl  $[\eta]$  von 0,038 und einem Schwefelgehalt von 14% mehr als 40 Tage reaktionslos und unter Gewichts Zunahme vertragen werden.

Die gerinnungshemmende Wirkung nimmt beim Durchlaufen des genannten Viskositätsbereiches nur wenig ab, und ein entsprechender Sturz wie bei der Toxizität wird nicht beobachtet. Dementsprechend besitzen die Chondroitinpolyschwefelsäureester mit einer Viskositätszahl  $[\eta]$  von 0,045 bis 0,03 eine erhebliche therapeutische Breite, während diejenigen mit einer Viskositätszahl  $[\eta] > 0,07$  zu toxisch sind, um überhaupt für therapeutische Zwecke in Frage zu kommen. Die Produkte des erfindungsgemäßen Verfahrens mit Viskositätszahlen von 0,045 bis 0,03 und einem Schwefelgehalt von 12 bis 15% weisen überdies gegenüber lipämischem Plasma eine gute Klärwirkung auf. Sie können deshalb als Mittel gegen Arteriosklerose verwendet werden.

Die genannten Chondroitinpolyschwefelsäureester mit großer therapeutischer Breite werden erfindungsgemäß dadurch erhalten, daß man Chondroitinschwefelsäure nach an sich bekannten Methoden derart einem partiellen Abbau und einer Sulfatierung unterwirft, daß das Endprodukt eine Viskositätszahl  $[\eta]$  von 0,045 bis 0,030 und einen Schwefelgehalt von 12 bis 15% aufweist.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann im einzelnen wie folgt durchgeführt werden: Chondroitinschwefelsäure, hergestellt aus Knorpel, beispielsweise nach der Vorschrift von K. H. Meyer und anderen (Helv. Chim. Acta, 31, 1402 [1948]), wird hydrolytisch, z. B. mittels Säuren oder Alkalien, auf einen niedrigeren Polymerisationsgrad gebracht. Dieser Polymerisationsgrad wird viskosimetrisch gemessen.

Alle Viskositätsmessungen werden zweckmäßigerweise mit 0-alkalischen Viskosimetern bei 25° ausgeführt. Die im folgenden verwendeten viskosimetrischen Begriffe sind wie folgt definiert:

Viskositätszahl (intrinsic viscosity)

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c}$$

wobei

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_L - \eta_0}{\eta_0} = \eta_{rel} - 1$$

000016

ist und  $\eta_L$  die Viskosität der Lösung,  $\eta_0$  die Viskosität des Lösungsmittels (0,05 N NaCl) und  $c$  die Konzentration in g/100 ccm bedeutet.

Der Grenzwert  $[\eta]$  wird graphisch bestimmt, indem man  $\eta_{sp}/c$  bei verschiedener Konzentration, z. B. 2,1 und 0,5 g/100 ccm, mißt und als Funktion von  $c$  aufträgt. Der Grenzwert wird durch Extrapolation auf unendliche Verdünnung erhalten.

Um ein Endprodukt mit der gewünschten Viskositätszahl zu erhalten, müssen die Bedingungen der Abbaureaktion und der Sulfatierung entsprechend aufeinander abgestimmt werden. Der Grad, bis zu dem die Chondroitinschwefelsäure hydrolytisch abgebaut werden muß, ist bedingt durch Temperatur und Dauer der darauffolgenden Sulfatierung, da die letztere den Polymerisationsgrad des Endproduktes ebenfalls beeinflusst. So wird z. B. bei einer Sulfatierungsdauer von 3 Stunden und einer Sulfatierungstemperatur von 90° (Volumenverhältnis Chlorsulfonpyridin 1:3) die Chondroitinschwefelsäure zweckmäßigerweise derart hydrolytisch abgebaut, daß das teilweise abgebaute Produkt vor der Sulfatierung eine Viskositätszahl  $[\eta]$  von 0,11 besitzt. Ein solches Produkt kann erhalten werden, indem man eine 10%ige wäßrige Lösung von Chondroitinschwefelsäure mit verdünnter Salzsäure bei 70° während etwa 5 Stunden erhitzt. Bei tieferen Temperaturen sind für die Abbaureaktion längere und bei höheren Temperaturen entsprechend kürzere Reaktionszeiten erforderlich. Die Hydrolysedauer ist natürlich auch abhängig vom Viskositätsgrad des Ausgangsmaterials, der je nach der Gewinnungsart verschieden sein kann. Man kann den Abbau auch durch Erwärmen der Chondroitinschwefelsäure in alkalischer Lösung durchführen.

Zur Sulfatierung der abgebauten Chondroitinschwefelsäure kann man im einzelnen z. B. so vorgehen, daß man das Abbauprodukt bei 80° unter Rühren in ein teilweise geschmolzenes Gemisch von Pyridin und Chlorsulfonpyridin (Volumenverhältnis 3:1) einträgt. Nach dem Eintragen wird das Gemisch vorzugsweise während 3 Stunden bei 90° und nachher noch während 2 Stunden ohne Wärmezufuhr weitergeführt.

Nach einer anderen Ausführungsform können der Abbau und die Sulfatierung in einer einzigen Stufe durchgeführt werden, indem man auf Chondroitinschwefelsäure bei 105 bis 115° während 2 bis 3 Stunden eine Mischung von Pyridin und Chlorsulfonpyridin einwirkt. Es ist zweckmäßig, die unangebaute Chondroitinschwefelsäure bei 90° in das Pyridinchlorsulfonpyridin-Gemisch einzutragen und das Ge-

000763

3 1

nisch während 21/2 Stunden bei 120° und anschließend während 2 Stunden ohne Wärmezufuhr zu rühren.

Die Aufarbeitung des Sulfatierungsgemisches, das nach der einen oder anderen der beschriebenen Ausführungsformen des Verfahrens erhalten wird, erfolgt zweckmäßigerweise so, daß der hochpolymere Anteil des Sulfatierungsproduktes mit Methanol oder mit einem anderen geeigneten Fällungsmittel, wie z. B. Äthanol oder Aceton, gegebenenfalls unter Zusatz von Natriumacetat zwecks Erleichterung der Fällung, zur Abcheidung gebracht wird. Der Niederschlag wird mit dem Fällungsmittel gewaschen und in wenig Wasser gelöst, worauf die Lösung mit Alkali, z. B. mit Natriumhydroxyd, auf  $pH$  9 eingestellt wird. Diese Lösung des rohen Alkalisalzes des Chondroitinpolyschwefelsäureesters wird erneut mit Methanol, gegebenenfalls unter Zusatz von Natriumacetat, ausgefällt und erneut in Wasser gelöst. Der Lösung wird zuerst Eis und dann unter Rühren eine Lösung eines Alkalisalzes, z. B. eine konzentrierte Lösung von Natriumhydrochlorid, zugesetzt, um das Alkalisalz des Chondroitinpolyschwefelsäureesters in das betreffende Alkalisalz, z. B. in das Natriumsalz, überzuführen. Das Alkalisalz wird durch Zentrifugieren oder Filtern isoliert, mit Wasser gut ausgewaschen und durch Eintragen in eine Alkalisierung, z. B. in eine Natriumcarbonatlösung, entweder bei Zimmertemperatur oder auch bei etwas höherer Temperatur in das Alkalisalz zurückverwandelt. Das ausgeschiedene Alkaloid wird abfiltriert und gut gewaschen. Das Filtrat wird mit Eisessig neutralisiert, nötigenfalls eingeeignet, und mit Methanol oder einem anderen der obengenannten, mit Wasser mischbaren Fällungsmittel versetzt, um eine Fällung zu erhalten. Diese Ausfällung kann nötigenfalls zwecks Reinigung oder Fraktionierung wiederholt werden.

Die so erhaltenen Verfahrensprodukte haben einen Schwefelgehalt von etwa 14% und eine Viskositätszahl  $\eta'$  von 0,045 bis 0,3 und sind im allgemeinen polydispers. Die Polydispersität läßt sich dadurch vermindern, daß man höher- oder niedermolekulare Anteile in an bekannter Weise durch Fraktionierung entfernt.

#### Beispiel 1

Man löst 1,8 kg Chondroitinschwefelsäure ( $\eta' = 0,35$ ;  $\alpha_D^{20} = -27^\circ$  ( $c = 2$ , in 0,5 N-NaCl) in 17,1 l Leitungswasser, erhitzt die Lösung in einem geeigneten Kolben auf 70°, gibt 560 cc konzentrierte Salzsäure zu und rührt das Gemisch 20 Minuten bei konstant gehaltener Temperatur. Sodann wird die Reaktionslösung mit etwa 700 cc konzentrierter Natronlauge neutralisiert, wenn nötig filtriert, auf ein Volumen von 4 l eingedampft und mit 30 l Methanol, in denen 600 g Natriumacetat gelöst sind, versetzt. Der dabei ausfallende Niederschlag wird abgetrennt und getrocknet. Ausbeute 1,6 kg; ( $\eta' = 0,105$ ).

Nun werden 7,8 l von über Kallauge getrocknetem Pyridin in einem 17,1 l-Dreihalskolben in einem Kältebad unter 170 mm auf -5° abgekühlt. Anschließend läßt man aus einem Tropftrichter und unter ständigem

Rühren innerhalb 3 Stunden 25 l destillierte Chlorsulfonsäure eintropfen. Die Temperatur soll dabei 80° nicht übersteigen.

Nach dem Eintropfen wird die teilweise flüssige Sulfatierungsmischung mit vorgekühltem Wasser unter Rühren bei 80° geschmolzen und portionsweise unter kräftigem Rühren mit 1,5 kg der partiell abgebauten Chondroitinschwefelsäure ( $\eta' = 0,105$ ) versetzt. Die Temperatur steigt dabei auf 90°. Bei dieser Temperatur wird das Reaktionsgemisch 3 Stunden und anschließend noch 2 Stunden ohne Wärmezufuhr weitergerührt. Der noch 50° warme Sulfatierungsmischung werden 40 l Methanol, in denen 1 kg Natriumacetat gelöst ist, unter Rühren zugesetzt, um den polymeren Anteil des Sulfatierungsproduktes auszufällen. Man läßt das Gemisch 15 Minuten stehen, worauf der größte Teil der überstehenden Mutterlauge mittels eines Siphons entfernt und der Rückstand abgematscht wird.

Der Rückstand wird in etwa 3 l Leitungswasser gelöst, worauf die Lösung durch Zugabe von etwa 700 cc konzentrierter Natronlauge auf  $pH$  9 eingestellt und erneut mit etwa 25 l Methanol versetzt wird. Der Niederschlag wird abgematscht und mit 5 l Methanol gewaschen. Anschließend wird das reine Natriumsalz des Sulfatierungsproduktes in 15 l destilliertem Wasser gelöst. Der Lösung werden 3 kg Eis und anschließend eine Lösung von 3,9 kg Natriumhydrochlorid in 8 l destilliertem Wasser unter kräftigem Rühren zugesetzt. Nach einiger Zeit entfernt man die überstehende Flüssigkeit mittels eines Siphons und rührt das zurückgebliebene Natriumsalz dreimal mit je 6 l destilliertem Wasser aus. Man läßt das Natriumsalz sich absetzen und entfernt das Wasser möglichst gut mittels eines Siphons. Sodann gibt man dem ausgewaschenen Natriumsalz 5 l Wasser und 800 g wasserfreies Natriumcarbonat zu und rührt das Gemisch während 18 Stunden bei Zimmertemperatur. Anschließend wird das abgeschiedene Natrium abfiltriert, das Filtrat mit Eisessig neutralisiert und auf ein Volumen von 3 l eingeeignet. Dem Konzentrat werden 25 l Methanol zugesetzt. Der ausgefallte Niederschlag wird abgematscht und getrocknet, gegebenenfalls zwecks Reinigung nochmals gelöst und ausgefällt. Ausbeute: 0,96 kg eines Chondroitinpolyschwefelsäureesters mit einer Viskositätszahl  $\eta'$  von 0,040 und einem Schwefelgehalt von 14,4%.

#### Beispiel 2 000017

Einem gemäß Beispiel 1 hergestellten und unter Rühren bei 90° geschmolzenen Gemisch von 2,5 l Chlorsulfonsäure und 7,2 l Pyridin werden langsam, d. h. innerhalb 30 Minuten, 1,2 kg nicht abgebaute, feingemahlene Chondroitinschwefelsäure ( $\eta' = 0,35$ ) zugesetzt. Die Temperatur steigt dabei auf 120°. Das Gemisch wird dann während 21/2 Stunden bei dieser Temperatur und anschließend während 2 Stunden ohne Wärmezufuhr gerührt. Anschließend wird die etwa 50° warme Sulfatierungsmischung nach den Angaben des Beispiels 1 aufgearbeitet. Ausbeute: 1,2 kg eines Chondroitinpolyschwefelsäureesters mit einer

900 752

Viskositätszahl  $[\eta]$  von 0,036 und einem Schwefelgehalt von 24%.

**PATENTANSPRUCH:**

Verfahren zur Herstellung von Chondroitinschwefelsäureestern durch partiellen Abbau und Sulfatierung von Chondroitinschwefelsäure, dadurch gekennzeichnet, daß man Chondroitinschwefelsäure nach an sich bekannten Methoden

derart einem partiellen Abbau und einer Sulfatierung unterwirft, daß das Endprodukt eine Viskositätszahl  $[\eta]$  von 0,045 bis 0,09 und einen Schwefelgehalt von 12 bis 25% aufweist.

In Betracht gezogene Druckschriften:  
Deutsche Patentanmeldung H 12517 IVc / 120;  
Helvetica Chimica Acta, 35. S. 574 bis 588  
(1952).

000618